

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ СОЕДИНЕНИЯ PIR-4 НА ОТЕК ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ БИЛАТЕРАЛЬНОЙ ОККЛЮЗИИ ОБЩИХ СОННЫХ АРТЕРИЙ У КРЫС

А.В. Воронков¹, Н.Б. Шабанова¹, М.П. Воронкова²

¹Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации;

²ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Проведено исследование противоотечной активности нового соединения PIR-4 на фоне церебральной ишемии у крыс. Эксперимент выполнен на 50 крысах-самцах линии Wistar. Глобальную ишемию головного мозга моделировали необратимой перевязкой общих сонных артерий. Установлено, что билатеральная окклюзия сонных артерий вызывает понижение уровня ионов кальция в крови ($2,31 \pm 0,06$) ммоль/л, метаболический лактатацидоз ($11,4 \pm 0,03$) ммоль/л, уменьшение потребления глюкозы мозговой тканью до ($0,49 \pm 0,34$) ммоль/л, что приводит к отеку головного мозга. Профилактическое введение винпоцетина, циннаризина и экспериментального соединения PIR-4 позволило скорректировать возникшие нарушения. Так, на фоне применения вещества PIR-4 лактатацидоз статистически значимо уменьшился до ($3,64 \pm 0,19$) ммоль/л, что сопоставимо с препаратами сравнения. Уровень кальция, у группы животных, получавших PIR-4, не достоверно повысился на 9,1 % относительно НК группы крыс, потребление глюкозы статистически достоверно повысилось до 15,33 %, степень гидратации тканей головного мозга в постischemическом периоде достоверно уменьшилась на 1,97 %. Полученные результаты свидетельствуют о противоотечной активности нового производного пиримидин-4-(1H)-а-PIR-4.

Ключевые слова: церебральная ишемия, крысы, отек головного мозга, лактатацидоз, производные пиримидина.

DOI 10.19163/1994-9480-2018-4(68)-117-121

ASSESSMENT OF INFLUENCE OF THE PIR-4 CONNECTION ON BRAIN EDEMA AT BILATERAL OCCLUSION OF THE GENERAL CAROTIDS AT RATS

A.V. Voronkov¹, N.B. Shabanova¹, M.P. Voronkova²

¹Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – affiliate of the FSBEI HE «The Volgograd State Medical University» of Public Health Ministry of the Russian Federation;
²FSBEI HE «Volgograd State Medical University» of Public Health Ministry of the Russian Federation

The study of the decongestant activity of the new compound PIR-4 on the background of cerebral ischemia in rats was conducted. The experiment was performed on 50 male Wistar rats. Global cerebral ischemia was modeled by irreversible ligation of common carotid arteries. It is established that bilateral occlusion of the carotid arteries causes a decrease in the level of calcium ions in the blood ($2,31 \pm 0,06$) mmol/l, metabolic lactic acidosis ($11,4 \pm 0,03$) mmol/l, decrease of glucose consumption of brain tissue to ($0,49 \pm 0,34$) mmol/l, which leads to swelling of the brain. Preventive administration of Vinpocetine, Cinnarizine and experimental compound PIR-4 allowed to correct the violations. So, against uses of the substance PIR-4 lactic acidosis significantly decreased to ($3,64 \pm 0,19$) mmol/l, which is comparable to the drugs of comparison. The level of calcium in the group of animals treated with PIR-4 did not significantly increase by 9,1 % relative to the NK group of rats, glucose consumption statistically significantly increased to 15,33 %, the degree of hydration of brain tissues in the postischemic period significantly decreased by 1,97 %. The obtained results indicate the decongestant activity of the new pyrimidine-4-(1H)-a-PIR-4 derivative.

Key words: cerebral ischemia, rats, brain edema, lactatacidosis, pyrimidine derivatives.

Триггерным механизмом при повреждении головного мозга ишемического генеза является снижение уровня мозгового кровотока. В условиях недостатка церебральной гемодинамики формируется целый каскад патобиохимических реакций, основными из которых являются: нарушение тканевого дыхания и энергетического обмена, лактатацидоз, глутаматно-кальциевая эксайтотоксичность [11]. Данные первичные патогенетические механизмы приводят к вторичному повреждению – отеку головного мозга. Выделяют два типа отека головного мозга: цитотоксический и вазогенный [8, 9]. При нарушении энергетического обмена наблюдается перестройка метаболизма по пути анаэробного гликолиза, что приводит к избыточному накоплению

ионов водорода, снижению pH среды и, следовательно, к увеличению содержания молочной кислоты [2]. Внутриклеточное накопление ионов кальция в нейронах также усугубляет лактатацидоз, стимулирующий развитие цитотоксического отека, переходящего при длительной окклюзии в вазогенный [4]. Таким образом, изучение соединений, уменьшающих метаболический лактатацидоз, содержание внутриклеточного кальция и, как следствие, ишемический отек можно считать одним из положительных звеньев церебропротекции ишемического инсульта. Производные пиримидин-4-(1H)-а зарекомендовали себя как соединения, проявляющие потенциальную церебропротекторную активность [5]. Вследствие этого можно предположить, что со-

единение PIR-4 способно снижать отек головного мозга, что и определяет цель нашего исследования.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Оценить влияние соединения PIR-4 на отек головного мозга, при билатеральной окклюзии общих сонных артерий.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные. В течение всего эксперимента животные находились в контролируемых условиях вивария: температура окружающего воздуха составила $(22 \pm 2)^\circ\text{C}$, влажность $(65 \pm 5)\%$. Крысы были размещены в макролоновых клетках со стальными решетчатыми крышками, оснащенными кормовым углублением. В качестве подстилочного материала использовали нехвойные древесные опилки. Животные содержались при естественном освещении на стандартном рационе питания со свободным доступом к воде и пище. Не реже одного раза в неделю меняли клетки, поилки для питья, подстилку. Все манипуляции над животными проводились в соответствии с требованиями лабораторной практики (GLP) и международными нормами экспериментальной этики (Европейская конвенция по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (Strasbourg, 22 June, 1998.))

Дизайн исследования. Исследование реализовано на 50 крысах-самцах линии Wistar, разделенных на 5 равных экспериментальных групп по 10 особей в каждой. Первая группа представлена ложнооперированными животными (ЛО). Второй (группа крыс негативного контроля – НК) и последующим группам моделировали необратимую окклюзию общих сонных артерий под хлоралгидратным наркозом (350 мг/кг) [6]. Третья группа животных получала экспериментальное вещество PIR-4 в дозировке 50 мг/кг [5]. Четвертой и пятой группе внутрибрюшинно вводили препараты сравнения винпоцетин ($3,2 \text{ мг/кг}$) и циннаризин ($5,6 \text{ мг/кг}$), соответственно [3]. Препараты сравнения и исследуемое соединение вводились внутрибрюшинно за 10 дней до воспроизведения ишемии головного мозга, последнее введение произведено за час до операции.

Определяемые показатели. Через 24 часа после острого нарушения мозгового кровообращения (ОНМК) осуществляли забор крови, с последующим получением сыворотки для биохимических исследований. Содержание лактата определяли с помощью набора реагентов «Молочная кислота Абрис +». Оптическую плотность (E) измеряли спектрофотометрически (длина волны 500 нм). Содержание молочной кислоты рассчитывали по формуле:

$$C = 3,34 * \frac{E \text{ пробы}}{E \text{ калибратора}} \text{ (ммоль/л).}$$

Концентрацию кальция определяли спектрофотометрически (длина волны 570 нм) стандартным набором реагентов «Ольвекс Диагностикум» по формуле:

$$C = 2,5 * \frac{E \text{ пробы}}{E \text{ калибратора}} \text{ (ммоль/л).}$$

Потребление глюкозы мозговой тканью вычисляли по разнице артериальной и венозной крови. Выраженность постишемического отека определяли по степени гидратации головного мозга. Для этого животных декапитировали и быстро извлекали головной мозг, взвешивали и оставляли в термостате на 24 часа при температуре 100°C . Процент влаги рассчитывали по формуле: $\frac{\text{Влажная масса}}{\text{Сухая масса}} * 100$ [10].

Статистическая обработка. Результаты опытов обрабатывали методом вариационной статистики с использованием пакета прикладных программ STATISTICA 6.0 (StatSoft, Inc., США). Для оценки нормальности распределения использовали критерий Шапиро-Уилка. В случае нормального распределения данных использовали t-критерий Стьюдента. При ненормальном распределении дальнейшую обработку данных проводили при помощи U-критерия Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Уровень молочной кислоты группы крыс негативного контроля составил $11,4 \pm 0,03$ (в 5,5 раз превысил показатель ложнооперированных животных), что говорит о выраженном лактатацидозе (табл. 1). На фоне введения исследуемого вещества PIR-4 содержание лактата было достоверно ниже группы НК на $68,1\%$ ($3,64 \pm 0,19$). Препараты сравнения винпоцетин и циннаризин статистически значимо снижали содержание молочной кислоты относительно контрольной группы животных на $57,2$ и $62,1\%$ соответственно. Стоит отметить, что применение вещества PIR-4 также достоверно уменьшало содержание лактата относительно препаратов сравнения (винпоцетина – на $25,4\%$, циннаризина – на $15,7\%$), данные показатели могут свидетельствовать об улучшении процессов энергетического обмена у крыс в постишемическом периоде. [7]

Таблица 1

Концентрация лактата и кальция в плазме крови на фоне ишемии головного мозга, ммоль/л

Группа	Лактат	Кальций
ЛО	$2,06 \pm 0,08$	$2,85 \pm 0,1$
НК	$11,4 \pm 0,03^*$	$2,31 \pm 0,06^*$
PIR-4	$3,64 \pm 0,19^{\#\alpha/\mu}$	$2,54 \pm 0,22$
Винпоцетин	$4,88 \pm 0,07^{\#}$	$2,49 \pm 0,08$
Циннаризин	$4,32 \pm 0,06^{\#}$	$2,74 \pm 0,11^{\#}$

*Достоверно относительно группы ложнооперированных животных ($p < 0,05$, t-критерий Стьюдента); #достоверно относительно контрольной группы животных ($p < 0,05$, t-критерий Стьюдента); α достоверно относительно группы крыс, получавших винпоцетин ($p < 0,05$, t-критерий Стьюдента); μ достоверно относительно группы крыс, получавших циннаризин ($p < 0,05$, t-критерий Стьюдента).

Одним из показателей, усугубляющим течение оксидативного стресса, является дополнительная секвестрация ионов Ca^{2+} в клетку [4]. Можно предположить, что увеличение концентрации свободного кальция в плазме крови косвенно способствует уменьшению его уровня в клетках. Содержание ионов кальция в плазме крови животных негативного контроля на 18,9 % было статистически достоверно ниже группы ЛО крыс ($2,31 \pm 0,06$). Экспериментальное вещество PIR-4 повышало уровень Ca^{2+} относительно животных негативного контроля на 9,1 %, однако это изменение не носило достоверного характера. Из препаратов сравнения стоит отметить циннаризин, который статистически значимо повышал концентрацию ионов кальция на 15,7 % относительно НК группы крыс.

Исходя из данных, представленных в табл. 1, можно предполагать, что экспериментальное вещество и препараты сравнения защищают мозг от выраженного лактатацидоза, при этом циннаризин также достоверно уменьшает кальций-опосредованное повреждение клеток [1].

Как видно из табл. 2, несмотря на значительное повышение уровня глюкозы крыс в постишемическом периоде у группы негативного контроля наблюдается существенное снижение (в 4,8 раз) потребления глюкозы мозговой тканью в сравнении с ложнооперированными животными. На фоне применения PIR-4 процент утилизации глюкозы в 3,2 раза достоверно превысил показатель контрольной группы и составил 15,33 %. Артериовенозная разница группы крыс, получавших вещество PIR-4, незначительно отличалась животных, которым вводили винпоцетин (12,76 %) и достоверно превышала данный показатель группы крыс, получавших циннаризин (9,97 %).

Таблица 2

Потребление глюкозы мозговой тканью на фоне ишемии головного мозга

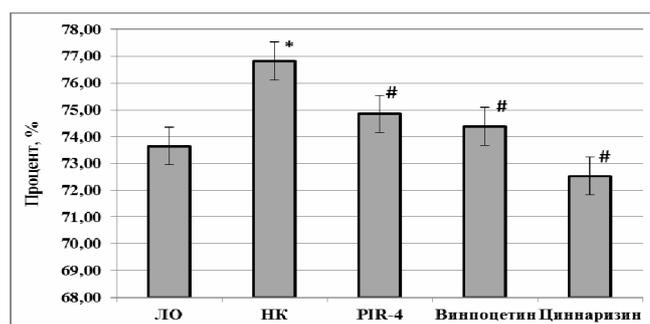
Группа	Потребление глюкозы, ммоль/л	Количество утилизации глюкозы, %
ЛО	$1,49 \pm 0,04$	22,78
НК	$0,49 \pm 0,34$	4,75*
PIR-4	$1,24 \pm 0,25$	15,33 [#] μ
Кавинтон	$1,37 \pm 0,06$	12,76 [#]
Циннаризин	$1,04 \pm 0,04$	9,97 [#]

*Достоверно относительно группы ложнооперированных животных ($p < 0,05$, t-критерий Стьюдента); #достоверно относительно контрольной группы животных ($p < 0,05$, t-критерий Стьюдента); μдостоверно относительно группы крыс, получавших циннаризин ($p < 0,05$, t-критерий Стьюдента).

Полученные данные свидетельствуют о том, что препараты сравнения винпоцетин и циннаризин, а в большей степени экспериментальное вещество PIR-4 предупреждают развитие глубоких нарушений энергообмена, за счет увеличения потребления глюкозы тка-

нями мозга на фоне ОНМК и, таким образом, предотвращают развитие молочнокислого ацидоза.

На рис. представлены данные содержания воды в мозге крыс в постишемическом периоде. Воспроизведение необратимой окклюзии общих сонных артерий у крыс приводило к образованию отека головного мозга, что проявлялось в статистически значимом повышении степени гидратации в мозговой ткани у животных группы НК на 3,17 %, ($76,82 \pm 0,32$ %), по сравнению с ложнооперированными крысами. Введение экспериментального соединения PIR-4, а также препаратов сравнения винпоцетина и циннаризина частично препятствовало развитию отека головного мозга крыс. При терапии веществом PIR-4 отечность достоверно снизилась на 1,97 %, ($74,85 \pm 0,27$ %), относительно контрольной группы животных. Препараты сравнения также статистически значимо уменьшали процент гидратации, так, на фоне применения винпоцетина данный показатель снизился на 2,44 %, максимальное снижение содержания воды в головном мозге отмечено на фоне введения циннаризина (на 4,29 % относительно негативного контроля).



*Достоверно относительно группы ложнооперированных животных ($p < 0,05$, t-критерий Стьюдента); **достоверно относительно контрольной группы животных ($p < 0,05$, t-критерий Стьюдента).

Рис. Степень гидратации головного мозга на фоне церебральной ишемии

Так как высокое содержание внутриклеточного кальция, нарушение утилизации глюкозы приводят к молочнокислому ацидозу и, следовательно, отеку головного мозга, можно считать, что за счет улучшения энергообмена, уменьшения глутаматно-кальциевой эксайтотоксичности и снижения уровня лактата в крови крыс исследуемое вещество PIR-4, а также препараты сравнения винпоцетин и циннаризин уменьшают степень гидратации ишемизированной мозговой ткани.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Глобальная ишемия головного мозга крыс, вызванная билатеральной окклюзией общих сонных артерий, приводит к отеку церебральных тканей (содержание воды повысилось на 3,17 %), связанному с понижением ионов Ca^{2+} в плазме крови на 18,9 %, что усугубляет течение оксидативного стресса.

уменьшением потребления глюкозы до 4,75 % и выраженным лактатацидозом, ($11,4 \pm 0,03$) ммоль/л.

2. Максимальное повышение концентрации ионов кальция в плазме крови крыс отмечено на фоне введения циннаризина ($2,74 \pm 0,11$) ммоль/л. Стоит отметить, что исследуемое вещество PIR-4 также повышало уровень кальция на 9,1 %, но полученные данные не имели достоверного характера.

3. Профилактическое введение соединения PIR-4 статистически значимо уменьшило возникший молочнокислый ацидоз до $3,64 \pm 0,19$, а также повысило потребление глюкозы в 3,2 раза относительно группы НК. Степень гидратации мозговой ткани достоверно снизилась на 1,97 %.

4. Полученные данные позволяют предполагать наличие противоотечной активности у экспериментального соединения PIR-4, что является важным звеном в церебропротекции ишемического инсульта.

ЛИТЕРАТУРА

1. Воронков А.В., Поздняков Д.И., Мамлеев А.В., Арлыт А.В. Влияние мексидола, тиоктовой кислоты и соединения АТАСЛ на изменение электролитного баланса в условиях экспериментальной церебральной ишемии // Успехи современной науки. – 2017. – Т. 9, № 3. – С. 159–162.
2. Гусев Е.И., Скворцова В.И. Ишемия головного мозга. – М: Медицина; 2001. – 328 с.
3. Дьякова И.Н. Экспериментальное исследование церебропротекторных свойств феруловой кислоты в условиях ишемии мозга: Автореф. дис. ... канд. фарм. наук. – Пенза: ПензГФА, 2007. – 24 с.
4. Литвинов А.А. Церебропротекторные свойства солей гамма-оксимасляной кислоты и некоторые аспекты механизма их действия: Дис. ... канд. мед. наук. – Волгоград: ВолгГМУ, 2015. – 196 с.
5. Луговой И.С., Кодониди И.П., Воронков А.В., Шабанова Н.Б., Кодониди М.И. Целенаправленный синтез n-пептидных производных пиримидин-4(1H)-она, обладающих церебропротекторными свойствами // Журнал научных статей. Здоровье и образование в XXI веке. – 2017. – Т. 19, № 8. – С. 195–199.
6. Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. – М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.
7. Митрохин Н.М., Турянский Е.Э., Макарова Л.М., Погорелый В.Е., Скачилова С.Я. Влияние винпоцетина при терапии с комбинацией антигипертензивных средств на метаболизм мозга животных с артериальной гипертензией и гипертензией, осложненной ишемией мозга // Научные ведомости. Серия Медицина. Фармация. – 2014. – № 26-1. – С. 98–103.
8. Недзьведь М.К., Нечипуренко Н.И., Пашковская И.Д., Щербина Н.Ю. Структурные изменения в головном мозге и водно-электролитные нарушения при острой церебральной ишемии у кроликов // Известия национальной академии наук Белоруссии. Серия медицинских наук. – 2011. – № 1. – С. 5–10.
9. Рыбалко А.Е., Кравченко Е.С. Новые «мишени» для фармакологической коррекции отека головного мозга при его повреждениях различного генеза // Проблемы

современных интеграционных процессов и пути их решения (Уфа). – 2017. – С. 197–201.

10. Hayashi T. Vascular endothelial growth factor: protection against brain damage with MCA occlusion in rats. In: Ischemic blood flow in brain / T. Hayashi, Y. Itoyama, R. Abe // Springer. – 2001. – P. 120–127.

11. Hertz L. Bioenergetics of cerebral ischemia: a cellular perspective // Neuropharmacology. – 2008. – № 55 (3). – P. 289–309. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2008.05.023.

REFERENCES

1. Voronkov A.V., Pozdnjakov D.I., Mamleev A.V., Arlyt A.V. Vliyaniye meksidola, tioktovoj kisloty i soedineniya ATACL na izmeneniye e"lektrolitnogo balans a v usloviyax e"ksperimental'noj cerebral'noj ishemii [Influence of mexidol, thiocitic acid and ATACL compound on electrolyte balance change in experimental cerebral ischemia.] *Uspexi sovremennoj nauki* [Successes of modern science], 2017, no. 9 (3), pp. 159–162. (In Russ.; abstr. in Engl.).
2. Gusev E.I., Skvorcova V.I. Ishemiya golovnogo mozga [Cerebral ischemia]. Moscow: Medicina, 2001. 328 p.
3. D'jakova I.N. E"ksperimental'noe issledovanie cerebroprotektorny'x svojstv ferulovoj kisloty v usloviyax ishemii mozga. Avtoref. dis. kand. farm. nauk [Experimental study of the cerebroprotective properties of ferulic acid in ischemia of the brain. Ph. D. (Pharmacology) Thesis]. Pyatigorsk: PyatGFA, 2007. 24 p.
4. Litvinov A.A. Cerebroprotektorny'e svojstva soley gamma-oksimaslyanoj kisloty i nekotory'e aspekty mexanizma ih dejstviya: Dis. kand. med. nauk [Cerebroprotective properties of gamma-hydroxybutyric acid salts and some aspects of their mechanism of action. Ph. D. (Medicine) Diss.]. Volgograd: VolgGMU, 2015. 196 p.
5. Lugovoj I.S., Kodonidi I.P., Voronkov A.V., Shabanova N.B., Kodonidi M.I. Celenappravlennyy sintez n-peptidnyh proizvodnyh pirimidin-4(1n)-ona, obladayuschih cerebroprotektornymi svojstvami [Purposeful synthesis of n-peptide derivatives of pyrimidine-4 (1H)-it having cerebroprotective properties]. *Zhurnal nauchnyh statej. Zdorov'e i obrazovanie v XXI veke* [Journal of scientific articles. Health and education in the 21st century], 2017, no. 19 (8), pp. 195–199. (In Russ.; abstr. in Engl.).
6. Mironov A.N. Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennyh sredstv [Guidelines for preclinical studies of drugs.]. P. 1. Moscow: Grif i K, 2012. 944 p.
7. Mitrohin N.M., Turjanskij E.Je., Makarova L.M., Pogorelyj V.E., Skachilova S.Ja. Vliyaniye vinpocetina pri terapii s kombinaciej antigipertenzivnyh sredstv na metabolizm mozga zhivotnyh s arterial'noj gipertenziej i gipertenziej, oslozhnennoj ishemiej mozga [The effect of Vinpocetine in therapy with a combination of antihypertensive agents on the metabolism of the brain of animals with arterial hypertension and hypertension complicated by brain ischemia]. *Nauchny'e vedomosti. Seriya Medicina. Farmaciya* [Scientific statements. Medicine series. Pharmacy], 2014, no. 26 (1), pp. 98–103 p. (In Russ.; abstr. in Engl.).
8. Nedz'ved' M.K., Nechipurenko N.I., Pashkovskaja I.D., Shherbina N.Ju. Strukturnye izmeneniya v golovnom mozge i vodno-elektrolitnye narusheniya pri ostroj cerebral'noj ishemii u krol'kov [Structural changes in the brain and water-electrolyte disorders in acute cerebral ischemia in rabbits].

Izvestiya nacional'noj akademii nauk Belorussii. Seriya medicinskix nauk [Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical Sciences Series], 2011, no. 1, pp. 5–10. (In Russ.; abstr. in Engl.).

9. Rybalko A.E., Kravchenko E.S. Novy'e «misheni» dlya farmakologicheskoy korrekcii oteka golovnogogo mozga pri ego povrezhdeniyax razlichnogo geneza // [New «targets» for pharmacological correction of brain edema in case of damage of different genesis]. *Problemy sovremennykh integracionnykh processov i puti ih*

resheniya [Problems of modern integration processes and their solutions], 2017, pp. 197–201. (In Russ.; abstr. in Engl.).

10. Hayashi T. Vascular endothelial growth factor: protection against brain damage with MCA occlusion in rats. In: *Ischemic blood flow in brain*. Springer, 2001, pp. 120–127.

11. Hertz L. Bioenergetics of cerebral ischemia: a cellular perspective. *Neuropharmacology*, 2008, no. 55 (3), pp. 289–309. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2008.05.023.

Контактная информация

Шабанова Наталья Борисовна – аспирант кафедры фармакологии с курсом клинической фармакологии ПМФИ – филиала ВолгГМУ, e-mail: Vahlushina@mail.ru